UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1956 - N° 102

UTILISATION DU PHOSPHORE RADIOACTIF DANS LE DOSAGE DES GONADOTROPHINES

Travail du Laboratoire de Pathologie générale
et expérimentale

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le lundi 16 Juillet 1956

PAR

Jacques-Pierre FERNAND

Elève de l'Ecole Principale du Service de Santé de la Marine
et des Troupes Coloniales
Diplômé de Médecine Tropicale

né le 13 août 1930 à Castelsarrazin (Tarn-et-Garonne)

Examinateurs de la Thèse / Juges

MM. SARIC, Professeur, Président.
CASTAGNOU, Professeur.
LAVIGNOLLE, Agrégé.
RIVIERE J., Agrégé.

BORDEAUX

UNION FRANÇAISE D'IMPRESSION
185, Cours de la Marne

1956

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547307_0032

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1956 - N° 102

UTILISATION DU PHOSPHORE RADIOACTIF DANS LE DOSAGE DES GONADOTROPHINES

Travail du Laboratoire de Pathologie générale
et expérimentale

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement le lundi 16 Juillet 1956

PAR

Jacques-Pierre FERNAND

Elève de l'Ecole Principale du Service de Santé de la Marine
et des Troupes Coloniales
Diplômé de Médecine Tropicale

né le 13 août 1930 à Castelsarrazin (Tarn-et-Garonne)

Examinateurs de la Thèse

MM. SARIC, Professeur, Président.
CASTAGNOU, Professeur.
LAVIGNOLLE, Agrégé.
RIVIERE J., Agrégé.

Juges

R. UNIV BIBLIOTHEEK LEIDEN

BORDEAUX

UNION FRANÇAISE D'IMPRESSION
185, Cours de la Marne

1956

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE G. PORTMANN

DOYEN : M. SIGALAS. — **ASSESSEUR** : M. TAYEAU

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. A MANDOUL, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY. CARLES, LEURET, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET, PERRENS, BEAUVIEUX, CREYX, MAURIAC.

PROFESSEURS

	MM.
Clinique médicale	N.
	BROUSTET
Clinique chirurgicale	PAPIN
	MASSÉ
Clinique d'accouchements.	RIVIÈRE
Clinique gynécologique...	MAGENDIE
Anatomie pathologique et microscopie clinique	N.
Anatomie	DUFOUR
Anatomie générale et histologie	MAYER
Hygiène et Clinique de la tuberculose	PIÉCHAUD
Médecine légale et médecine du travail	DERVILLÉE
Electroradiologie et Clinique d'électricité médicale	REBOUL
Chimie	MESNARD
Matière médicale	GOLSE
Pharmacie	VITTE
Physiologie	FABRE
Clinique médicale des maladies des enfants.	FONTAN
Zoologie et parasitologie.	SIGALAS

	MM.
Pathologie générale et expérimentale	SARIC
Clinique ophtalmologique.	BESSIERE
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie	POUYANNE
Clinique médicale et des maladies infectieuses	AUBERTIN
Chimie biologique et médicale	TAYEAU
Physique médicale et pharmaceutique	PIFFAULT
Médecine coloniale et Clinique des maladies exotiques	BONNIN
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.	JOULIA
Clinique des maladies des voies urinaires.	DARGET
Clinique des maladies nerveuses et mentales	DELMAS-MARSALET
Clinique d'oto-rhino-laryngologie	PORTMANN
Toxicologie et hygiène appliquée	CASTAGNOU
Clinique odonto-stomatologique	DUBECQ
Botanique et cryptogamie.	GIRARD
Thérapeutique	F.-J. TRAISSAC
Hydrologie thérapeut. et climatologie.	DUBARRY

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL :

M. BLANQUET (Section Pharmacie)

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MM. MAHON (Obstétrique), PAUTRIZEL (Parasitologie), Mlle ROUGIER (Physiologie), M. MOUSTARDIER (Bactériologie) CAZAUX (Pharmacie, 3e section)

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.
Anatomie pathologique	LEGER
Anatomie	RIGAUD
	CABANIE
Biochimie médicale	NEUZIL
Pathologie expérimentale	FAURE
Physique médicale	DUHAMEL

	MM.
Pharmacie (1re section)	R. GOLSE
	ROMAIN
Pharmacie (2e section)	MASQUELIER
	QUILICHINI

CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ R. STOLL (Histologie)

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.
Médecine générale	BERGOUIGNAN
	LENG-LEVY
	MORETTI
	LAVIGNOLLE
	MARTIN-DUPONT
	DAVID-CHAUSSE
	J. RIVIERE
Chirurgie générale	LAUMONIER
	CHAVANNAZ
	VILLAR
	TINGAUD
	DEPAULIS
	DARMAILLACQ

	MM.
Obstétrique	CHASTRUSSE
	FAUGERE
Ophtalmologie	BESSIERE
	CORCELLE
Oto-rhino-laryngologie	DESPONS
	M. PORTMANN
Dermatologie et syphiligraphie	LE COULANT
Pédiatrie et puériculture.	VERGER
Médecine légale et médecine du travail	L'ÉPÉE
Electro-radiologie	LACHAPÈLE
Odonto-stomatologie	BENOIT
Urologie	LANGE
Neurologie et psychiatrie	BLANC
Pneumo-phtisiologie	FREOUR

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER
Accouchements	CHASTRUSSE
	FAUGERE
Puériculture	VERGER
	PERY
Législation pharmaceutique	COUSTOU
Cryptogamie	LAUBIE
Obstétrique sociale	MAHON
Organographie et physiologie végétale	TEMPÈRE
Chimie biologique	MARQUEVIELLE
Chimie analytique	BABIN
	VILLAR
	CHAVANNAZ
Pathologie chirurgicale	TINGAUD
	LAPORTE
	DARMAILLACQ

	MM.
Zoologie pharmaceutique	BAILENGER
Physiologie	BENELLI
Toxicologie et Hygiène	Mlle LARCEBAU
Phytopharmacie	CORTESI
Droit médical international	AUBY
Médecine légale	L'EPEE
Séméiologie médicale	LAVIGNOLLE
Séméiologie chirurgicale	DEPAULIS
Embryologie	STOLZ
Pathologie médicale	BERGOUIGNAN
	LEVY
	MORETTI
	DAVID-CHAUSSE
	RIVIERE
	MARTIN-DUPONT

Le Secrétaire principal de la Faculté : GAYRAUD

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

A MA MERE ET A MON PERE

A MA FEMME

A MA SŒUR

A TOUS LES MIENS

ET A TOUS CEUX QUI ME SONT CHERS

A MONSIEUR LE MEDECIN COMMANDANT

L. SCARBONCHI

Chirurgien des Hôpitaux militaires

A MES AMIS ET MES CAMARADES

DE L'ECOLE DE SANTE NAVALE

A MES CAMARADES DU LABORATOIRE

DE PATHOLOGIE GENERALE ET EXPERIMENTALE

A NOS PROFESSEURS ET AUX OFFICIERS
DE L'ECOLE PRINCIPALE DU SERVICE DE SANTE
DE LA MARINE ET DE LA FRANCE D'OUTRE-MER

A NOS MAITRES DE LA FACULTE
ET DES HOPITAUX DE BORDEAUX

A MONSIEUR LE MEDECIN GENERAL DE 2e CLASSE

LAHILLONNE

Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé
de la Marine et de la France d'Outre-Mer
Médecin des Hôpitaux maritimes
Commandeur de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre 1939-1945
Officier du Mérite Maritime

A MONSIEUR LE MEDECIN EN CHEF DE 1re CLASSE

CONSTANS

Sous-Directeur de l'Ecole Principale du Service de Santé
de la Marine et de la France d'Outre-Mer
Spécialiste des Hôpitaux maritimes
Officier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre 1939-1945

A NOS JUGES :

MONSIEUR LE DOCTEUR J. RIVIERE

Agrégé de Médecine générale
Médecin des Hôpitaux

Inspirateur de ce travail, avec notre gratitude pour ses conseils et l'aide qu'il nous a apportée. En témoignage de notre profonde et respectueuse reconnaissance.

MONSIEUR LE DOCTEUR A. LAVIGNOLLE

Agrégé de Médecine générale
Médecin des Hôpitaux

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. CASTAGNOU

Professeur de Toxicologie et d'Hygiène appliquée
Pharmacien des Hôpitaux psychiatriques
Officier d'Académie

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SARIC

Professeur de Pathologie générale et expérimentale
Médecin des Hôpitaux
Officier de l'Instruction Publique

Nous le remercions bien vivement de l'accueil si bienveillant qu'il nous a fait dans son Laboratoire, de l'intérêt qu'il a bien voulu nous témoigner et de l'honneur qu'il nous fait en présidant cette thèse.

INTRODUCTION

L'Endocrinologie actuelle, malgré sa connaissance de plus en plus complète d'une clinique particulièrement complexe, ne peut que souhaiter pour ses diagnostics l'appui de certains dosages biologiques. Mais encore faut-il que ces dosages soient praticables d'une manière assez facile et surtout que leurs résultats présentent un caractère de constance très rigoureuse, bien plus importante qu'une précision très grande le plus souvent illusoire. Ces réserves sont particulièrement importantes dans le domaine qui nous occupe : le dosage des substances gonadotrophiques d'origine hypophysaire.

Un dosage biologique fait intervenir de nombreux facteurs qui auront difficilement ce caractère de constance pourtant bien nécessaire. Par exemple, l'animal réactif choisi : son poids, sa taille, son âge, ses multiples réactions physiologiques, sont autant de facteurs qui font saisir le peu de points communs existant entre un animal « réactif » et un « réactif » chimique que l'on peut espérer toujours trouver identique à lui-même. Nous n'insisterons pas plus pour le moment sur ce point qui, approfondi, deviendra le problème de l'interprétation des résultats.

De plus, la nature des substances étudiées apporte de nouvelles difficultés. Elles sont multiples, d'origines différentes et de nature chimique pas assez connue ni précisée pour que l'on ait pu les synthétiser. De même leur physiologie n'a été entre-

vue d'abord que par bribes et ce n'est qu'avec le temps, aidé par des travaux extrêmement nombreux, que l'on peut avoir une vue d'ensemble de l'enchaînement de ces mécanismes physiologiques qui sont représentés par : l'élaboration des substances gonadotropes par l'hypophyse, les relations de ces dernières avec tous les autres produits de cette glande, leurs actions sur les organes effecteurs, et enfin leur élimination, stade où nous les étudions. Mais il reste beaucoup d'inconnues dans cette physiologie des gonadotrophines.

Nous pensons inutile de rappeler l'historique et même les notions essentielles relatives à ces substances. Ce sont là des connaissances suffisamment répandues et entrées dans la pratique ; de toute façon, c'est leur dosage et non leur nature qui nous retient.

La méthode que nous pratiquions jusqu'alors pour le dosage de ces gonadotrophines hypophysaires était celle appliquée par Girardeau (4) selon la technique de Bradbury, Brown et Brown (1) : elle comprend deux étapes principales que nous allons rappeler succinctement.

Concentration

Les urines recueillies sont celles des 24 heures. Les gonadotrophines contenues sont concentrées par adsorption sur kaolin d'où elles sont éluées par l'ammoniaque et précipitées par l'alcool à 95°. Une centrifugation permet finalement d'obtenir sous forme d'un précipité toutes les gonadotrophines éliminées dans les vingt-quatre heures ; on peut alors les diluer dans le volume de sérum physiologique désiré pour poursuivre les différentes opérations.

Dosage proprement dit

La substance active obtenue est injectée à des rates impubères dont on prélève après sacrifice les ovaires et les utérus qui sont disséqués et pesés. Les poids sont portés en référence sur une courbe d'étalonnage établie au préalable et avec précision, par de nombreuses mesures.

Sans entrer dans la critique de cette méthode, nous pouvons dire que c'est pour essayer de mettre au point une technique donnant une sensibilité et une constance accrues, jointes à une réalisation pratique peut-être plus simple, que nous avons entrepris ce travail faisant appel à l'usage de l'isotope radioactif P.32 du phosphore.

Nous décrirons en premier lieu notre technique, nous réservant de joindre la justification du principe avec la discussion des résultats par la suite.

Nous tenons à réserver une place dans cette introduction pour dire à quel point fut importante l'aide que nous apportèrent le Laboratoire de Physique Médicale de la Faculté de Médecine et les Services de la Fondation Bergonié. M. le Professeur P. A. Lachapèle, à lui seul,déjà rendit possible notre expérimentation en nous ouvrant généreusement les réserves en phosphore radioactif de la Fondation. Quant à l'accueil qui nous fut réservé par M. le Professeur Blanquet et MM. Mounier et Meyniel, il serait difficile de le décrire. Tout ce que nous pouvons dire, c'est que nous avons entrevu là, durant cette année, le grand plaisir et surtout l'énorme profit qu'il y aurait pour tous les Laboratoires de Recherches à unir très simplement et très amicalement leurs efforts.

PRINCIPE DU DOSAGE

Quand on injecte à des rates de 21 jours, donc impubères, une préparation à activité gonadotrophique le système génital de l'animal, stimulé dans son ensemble, est le siège d'une prolifération intense, corollaire d'une grande activité mitotique. Le phosphore présentant une grande affinité pour tous les tissus en voie de prolifération se trouvera fixé en quantité d'autant plus importante au niveau du système génital que celui-ci aura été davantage stimulé. Il est important de noter tout de suite que l'on peut considérer que le phosphore va se situer à l'intérieur même de la cellule ou plus exactement du noyau car il doit participer à la constitution des acides nucléiques.

C'est cette propriété du phosphore qu'avaient utilisée MANARO, WALTER S. HILL et FOURNIER (7), auteurs travaillant à Montevideo pour doser les œstrogènes. C'est leur publication qui nous a servi de point de départ. Ils avaient d'ailleurs mis au point antérieurement une technique où le témoin de la prolifération de l'organe récepteur (dans ce cas la vésicule séminale ou la prostate de rat) était l'observation histologique de l'apparition de mitoses colchiciniques.

DESCRIPTION DE NOTRE TECHNIQUE

Le schéma du dosage ne pouvait beaucoup différer de celui basé sur une mesure pondérale comme l'était celui décrit par GIRARDEAU.

Nous en rappelons les deux temps.

1° L'extraction du produit actif à doser. Extraction qui est faite conjointement à sa concentration.

2° Le dosage. Injection du produit extrait à l'animal réactif et mesures.

Nous laissons complètement de côté le premier de ces deux temps que nous considérons maintenant comme satisfaisant, et dans sa réalisation, et dans ses résultats.

Nous décrirons seulement la partie du dosage proprement dit. Les travaux relatés représentent l'élaboration de la courbe d'étalonnage.

DÉTAIL DE NOTRE TECHNIQUE

a) CHOIX DES ANIMAUX :

Il ne peut être question ici du choix de l'animal réactif : rate ou souris, animaux hypophysectomisés ou non ; ceci fait partie d'une discussion, d'ailleurs très épineuse, que l'on peut trouver résumée dans la thèse de GIRARDEAU.

Nous ne nous sommes servis que de rates impubères de race Wistar. Le critère utilisé pour leur choix fut l'âge, qui allait de 19 à 23 jours. Dans la mesure du possible, chaque expérience était effectuée avec des animaux provenant d'une même nichée ; ceci pour éviter certaines disproportions entre les animaux (les animaux d'une nichée de 10 membres et ceux d'une de 5 n'atteignant pas à 21 jours des poids identiques).

De toutes façons, chaque expérience comportait au moins deux témoins.

b) LES INJECTIONS :

1° *D'hormone.* — L'hormone utilisée fut celle qui nous a été fournie toujours avec beaucoup d'amabilité par les Laboratoires Choay qui ont bien voulu réaliser pour nous un conditionnement particulier en flacons titrés à 2 unités internationales. Les quantités injectées furent 1/8, 1/4, 3/8, 1/2 et 1 unité. Le choix de ces doses sera justifié lors de la discussion.

L'hormone était diluée extemporanément dans du sérum physiologique ; le volume de l'injection était de 1 centimètre cube. Elle était pratiquée sous-cutanée dans la région dorsale avec une seringue munie d'une aiguille suffisamment longue pour permettre de pousser le liquide assez loin du point de piqûre et d'éviter ainsi tout reflux lors du retrait de l'aiguille.

2° *De phosphore.* — Le phosphore utilisé était celui du Commissariat à l'Energie Atomique, livré en flacons contenant un centimètre cube de liquide riche de 1,5 à 2 microcuries suivant les échantillons.

Les doses pratiquées allaient de 5 à 100 microcuries.

Etant donné que nous ne disposions de ce phosphore que dans la limite où nous ne gênions pas les Services de la Fon-

dation Bergonié, nous ne pouvions demander une dilution des échantillons ; ce qui aurait pu nous permettre de prendre nos doses dans un volume de 10 centimètres cubes, par exemple, au lieu d'être limités par ce seul centimètre cube. Nous étions amenés à prendre des volumes de l'ordre du 1/10 ou même du 1/100 de centimètre cube. C'est dire la difficulté que nous avions à reproduire toujours les mêmes doses.

Les injections étaient pratiquées exactement de la même manière que celles d'hormones au voisinage de ces points d'injections antérieures. De même, le volume injecté était, là aussi, le plus souvent de un centimètre cube, obtenu par dilution avec du sérum physiologique. (N.-B.).

3° *Rythme des injections.* — Dans la majeure partie des expériences, les injections d'hormone furent faites en une fois.

Plus rarement elles furent faites en trois fois à vingt-quatre heures d'intervalle.

Mais toujours l'injection de phosphore suivait au bout de vingt-six heures celle d'hormone. Ce temps est justifié par les expériences de Nati et Odeblad (8).

c) PRELEVEMENT DES UTERUS :

Tous les animaux furent sacrifiés par asphyxie, six heures après l'injection de phosphore.

N.-B. — Il est important que le sérum physiologique employé soit de bonne fabrication, comme celui utilisé en clinique, et qu'il ne contienne aucun corps en suspension ; le phosphore risquerait sans cela d'entrer en combinaison et de précipiter.

Le système génital en bloc était alors prélevé et les utérus immédiatement disséqués. Cette dissection devait être poursuivie assez soigneusement car la graisse et le tissu conjonctif n'ont pas le même rôle à jouer vis-à-vis du phosphore que les tissus utérins.

d) PESEE DES UTERUS :

Dès la dissection terminée, sans aucune préparation, les utérus étaient pesés. Cette opération était effectuée sur une balance de torsion sensible au 1/10 de milligramme.

L'habitude de ces opérations permit de respecter des délais toujours identiques tels que les utérus furent pesés au même degré d'hydratation ou plutôt de déshydratation.

Toutes ces opérations, sauf les injections de phosphore, n'ont aucun caractère d'originalité, nous les pratiquions déjà depuis l'utilisation de la méthode pondérale.

Nous abordons maintenant les opérations propres à l'utilisation du P.32.

e) PREPARATION DES UTERUS :

Dès la pesée effectuée, les utérus étaient placés dans de petites cupules en matière plastique qui sont les porte-objets du compteur de radiations utilisé ultérieurement. Elles ont approximativement un diamètre de deux centimètres et une contenance de deux centimètres cube.

Il était ajouté dans chaque cupule, munie d'un utérus, un centimètre cube d'acide chlorhydrique 2 N et elles étaient placées dans une étuve réglée à 70° pour une durée d'environ

vingt-quatre heures. Les cupules étaient placées pour le passage à l'étuve dans des boîtes de Petri ceci afin que l'acide ne s'évapore pas trop rapidement, et qu'il agisse le plus longuement possible et à chaud sur les utérus pour les hydrolyser.

A la fin de cette préparation qui était donc une hydrolyse par action d'un acide à chaud, il restait au fond de chaque cupule la trace de l'utérus très réduit de volume et desséché. L'expérience nous a montré que la quasi totalité de la radioactivité que renfermait un utérus d'animal injecté, se trouvait après cette préparation concentrée au niveau de cette trace.

Nous expliquons tout de suite l'intérêt de cette hydrolyse en disant qu'elle permet d'éviter une absorption des radiations à l'intérieur même de l'organe, absorption qui serait une source importante d'erreurs au moment de la mesure de la radioactivité.

f) COMPTAGE DE LA RADIOACTIVITE :

L'appareil que nous avons utilisé était un compteur de radiations du type Geiger-Muller.

Son ampoule placée dans un socle était toujours à la même distance des objets à tester, les cupules étant introduites dans ce socle après leur mise en place sur une lamelle coulissante.

Le mouvement propre de l'appareil (back-ground des Anglo-Saxons) était en moyenne de 40 coups/minute ; il était considéré comme toujours identique et étant de peu d'importance à côté des valeurs mesurées, négligé.

On vérifiait la non-radioactivité des cupules avant chaque expérience.

La radioactivité de chacun des utérus était, en général, mesurée deux fois ; en changeant de préférence l'orientation de la cupule sous l'ampoule. Il est à noter que les deux chiffres obtenus différaient au maximum de 5 à 6 % et étaient très souvent identiques.

RÉSULTATS DES EXPÉRIENCES

Toutes les expériences pratiquées ne présentent pas pour les résultats le même intérêt. Ne peuvent être évidemment comparés que des tests effectués dans des conditions expérimentales rigoureusement identiques ; et l'on sait combien il est difficile d'obtenir cette identité.

Nous avons étudié la radioactivité des utérus de rates ayant reçu du P.32 avec ou sans injection d'hormone gonadotrophique hypophysaire chez environ 200 animaux. Nous pensions limiter nos résultats à 130 d'entre eux. Mais finalement, pour donner une vue plus synthétique et plus frappante de l'aboutissement de nos travaux, c'est 62 expériences seulement que nous publions.

En effet pour ce lot, uniquement, a été effectuée une « mesure témoin » de l'activité de la préparation de P.32 injectée à chaque animal ; activité exprimée comme le résultat final en nombre de coups/minute.

Le résultat de chaque expérience est exprimé par un chiffre qui représente ce que nous pouvons appeler la « *radioactivité spécifique* » de l'utérus de l'animal expérimenté. C'est-à-dire qu'entrent en considération :

— le poids de l'organe en milligrammes ;

— le nombre de coups/minute injectés ;

— le nombre de coups/minute retrouvés au niveau de l'utérus.

Les deux derniers chiffres donnent le « *rendement* » de l'organe, mais de l'organe en bloc. L'introduction du facteur poids permet de mettre en comparaison les résultats fournis par tous les utérus quelle que soit leur réaction quantitative (la réaction qualitative étant par principe de base toujours la même).

Pour être plus clair, nous pouvons dire que les chiffres que nous donnons auraient pu être obtenus en ne traitant à chaque expérience qu'un seul milligramme d'utérus.

Les 62 résultats que nous utilisons finalement se décomposent en :

— 32 animaux témoins ;

— 2 animaux injectés avec 1/8 d'unité ;

— 12 animaux injectés avec 1/4 d'unité ;

— 5 animaux injectés avec 3/8 d'unité ;

— 11 animaux injectés avec 1/2 d'unité.

Ce petit nombre de résultats s'explique par les difficultés que nous avons rencontrées avant de pouvoir arrêter un protocole défini.

TABLEAU N° 1. — POIDS UTERINS

Témoins	1/8	1/4	3/8	1/2
17. 12.		20.		
16. 17. 17.				
14.		22.		
17. 16.		22. 29 20.		
15. 18.	18. 16.			26
16.				
15. 13. 15.				
12. 15. 14. 13. 14.				
13. 15. 15. 15.		16 20 18	33. 15.	19. 24 18.
19. 14.				52 42
18. 19.			18. 24. 22.	
18. 17.		20. 17. 22.		
10. 13.				19. 19. 19.
21.				38. 34.
15.	17.	20.	22.	28.

TABLEAU N° 2. — RADIOACTIVITES SPECIFIQUES UTERINES

P.32	Témoins	1/8	1/4	3/8	1/2
8.	2,5		2,8		
»	3.				
14.	2,9				
»	2,9				
»	2,9				
16.	2,2		2,7		
32.	0,9		1,2		
»	1,2		1.		
»			1,4		
32.	1,4	1,2			2.
»	1,1	2,6			
32.	1,7				
33.	1,1				
»	2,4				
»	1,1				
37	1,2				
»	1,2				
»	2.				
»	1,1				
»	0,5				
37	1,9		2.	4,1	4,2
»	1,9		2,8	1,6	3,7
»	1,9		2.		2,7
»	1,9				
41	2,8				6,1
»	2,4				8,1
41	1,7			1,7	
»	1,7			2.	
»				2,5	
43.	2.		2,3		
»	1,7		2,2		
»			2,6		
43.	2,6				3,4
»	2,5				3,4
»					3,4
60.	2,7				6,2
»					7,7
	1,9	1,9	2,1	2,3	4,6

N.-B. — Tous les chiffres donnés expriment la radioactivité spécifique. Cette notion a déjà été définie page 23. La première colonne indique l'activité du phosphore injecté en nombre de coups-minute. Chaque chiffre doit être multiplié par 10^5.

DISCUSSION

Notre but était, rappelons-le, de mettre au point un dosage simple et assez précis des hormones gonadotrophiques hypophysaires éliminées dans l'urine, d'où nous les extrayons par une technique déjà éprouvée, puis de noter l'effet de ces substances sur la fixation du P.32 au niveau des utérus de rates impubères.

Simple, notre méthode devait l'être en ne nécessitant que des lots peu importants de rates de 19 à 23 jours (race Wistar), des quantités de P.32 de l'ordre de 20 microcuries et évidemment un compteur de radiations. Les différentes opérations ne présentant pas un caractère de longueur ni de difficultés excessives.

Précise, nous pensions obtenir pour notre dosage une sensibilité de 0,50 ou peut-être 0,25 unité internationale ; mais une unité aurait été déjà très satisfaisante. Ceci s'entend bien comme une sensibilité et non comme un degré de précision ; tout dosage biologique entraînant par sa nature des causes d'erreurs multiples, nécessite, pour l'énoncé de ses résultats, des réserves assez larges sur la réalité du chiffre donné. Nous pensons que bien souvent, en matière de dosages biologiques, 20 % d'erreur doivent être admis.

Pour en revenir à notre cas, les prévisions décrites ne pouvaient être réalisées qu'en injectant des quantités d'hormone n'ayant pas une activité supérieure à deux unités. Car c'est un

phénomène que nous avons souvent observé : une quantité trop importante de produit actif ne provoque plus, à partir d'un certain niveau, une stimulation proportionnelle à son activité, au contraire même, elle n'a plus aucun effet. Il faut, et c'est ce qui était pratiqué dans la méthode décrite par GIRARDEAU, se trouver à l'aide de dilutions dans la zone d'action optimum.

C'est une publication, que nous avons déjà citée, qui nous a fourni le schéma général d'un dosage biologique utilisant le P.32. MANARO, WALTER S. HILL et FOURNIER ont cherché à tester les gonadotrophines chorioniques par la stimulation qu'elles exercent sur la prostate et les vésicules séminales de rats infantiles, décelée au moyen de la fixation du P.32. Ce n'était qu'un début d'expérimentation que ces auteurs publiaient. Ils obtenaient une bonne réaction qualitative : la fixation du phosphore était nettement plus élevée chez les animaux traités que chez les témoins. Mais ils n'avaient pas étudié la réaction quantitative due à des différentes doses d'hormone. Cette notion de réaction quantitative et de réaction qualitative est très importante, nous y reviendrons, mais il est déjà évident que c'est ce qui conditionne la réalisation de ce dosage et surtout son utilisation pratique.

Nous pratiquions depuis un certain temps le dosage par méthode pondérale, nous avions donc une technique bien en main, faisant appel aux ovaires et aux utérus de rates ; d'autre part la dissection de prostates de rats de 21 jours et l'isolement de leur lobe ventral nous paraissait sinon délicat du moins sujet à des erreurs opératoires tant à cause de la taille qu'à cause de la consistance friable de ce tissu. Etant donné, comme nous l'avons déjà expliqué, que le phosphore n'a qu'un rôle de témoin, nous avions pensé qu'il jouerait le même rôle à l'égard d'utérus de rates qu'à l'égard de prostates de rats. De même, au lieu d'œstrogènes, c'étaient des gonadotrophines que nous désirions étudier, mais ces substances ayant comme propriété

de provoquer la stimulation du tractus génital d'un animal impubère (par l'intermédiaire de l'ovaire sécréteur d'œstrogènes), nous étions bien fondés à croire que nous pourrions obtenir certains résultats positifs.

Nous venons ainsi de justifier les principes généraux qui étaient à l'origine de nos travaux. Nous voulons aborder maintenant la discussion de la partie technique. Nous repoussons ainsi en tout dernier lieu l'exposé et la discussion des résultats proprement dits. Nous désirons ainsi fournir au lecteur le plus d'éléments utiles à cette discussion.

Nous ne reprenons pas tous les détails de la technique mais les éléments les plus importants pour la constance des résultats. Ils sont au nombre de trois :

— L'hormone injectée.

— L'isotope « indicateur » du dosage.

— L'animal réactif.

— L'HORMONE INJECTEE :

Nous nous sommes servis de préparations d'hormone fournies par les Laboratoires Choay titrées en unités internationales. Il est important de souligner que cette substance diffère des nombreuses préparations d'*hormones gonadotrophiques chorioniques* (H.C.G. des auteurs anglo-saxons). L'hormone que nous avons utilisée est extraite de glandes pituitaires de bovidés. Sans nous prononcer sur le point encore litigieux du nombre des gonadotrophines pituitaires en dehors de la gravidité, on peut admettre que la *Gonadotrophine hypophysaire Choay* renferme les facteurs F.S.H. et I.C.S.H. en proportions physiologiques. De toute manière, il ne peut être question en l'occurrence d'hormone chorionique. Cela constitue un élément important de la discussion si l'on veut bien considérer que nos recherches s'appliquent au dosage des hormones pituitaires chez l'homme et la femme non gravide.

Nous rappelons que les doses pratiquées allaient de 0 à 1 unité, elles étaient choisies aussi faibles car nous pratiquions les injections en une fois. Nous avons fait des séries d'animaux où nous injections des doses de 1 à 4 unités mais fractionnées et étalées sur 3 jours. Les poids obtenus concordaient avec ceux de la courbe d'étalonnage de la méthode pondérale. Ces résultats n'étaient pas utilisables au point de vue de la mesure de la radioactivité, le protocole expérimental n'étant pas identique à celui décrit ici.

Il faut remarquer que jusqu'à une unité, une injection unique ou trois injections donnent les mêmes résultats.

— L'ISOTOPE :

Nous abordons cette partie qui est du domaine de la physique avec appréhension, nos connaissances en cette discipline en

général et en physique nucléaire en particulier étant minces. Aussi, dès le début de notre travail, nous avons sollicité les grandes connaissances et l'expérience du Laboratoire de Physique de la Faculté de Médecine et du Laboratoire des Radio-Isotopes de la Fondation Bergonié.

Deux points sont à considérer : le premier, d'ordre purement physique, ayant trait à l'obtention de doses précises de P.32. Le second d'ordre biologique concernant le métabolisme du P.32.

Premier point :

Nous n'indiquerons que les quelques notions indispensables : le P.32 a une période radioactive de 14 jours. Cette durée, qui oblige à prendre des précautions de manipulation un peu plus grandes que pour des corps à période plus courte, permet par contre une plus grande souplesse dans les limites de temps de son utilisation. Il faut veiller à ne pas souiller tous les objets devant rester non radioactifs, principalement : le compteur, la seringue servant aux injections d'hormone, les cupules en réserve, etc.

Le rayonnement émis est constitué à peu près exclusivement de rayons β. Ce rayonnement a donc une pénétration faible ; il est arrêté par quelques centimètres d'air et quelques millimètres de liquide. A l'intérieur même de la source, il se produit une absorption importante (self absorption). Il serait pour cette raison idéal d'opérer les mesures sur un matériel en couches minces (quelques dixièmes de millimètre), en poudre sèche, et ayant toujours une surface identique. Nous nous rapprochions de ces conditions en hydrolysant et en desséchant à l'étuve notre matériel.

Le pouvoir radioactif du phosphore est exprimé en comparaison avec le corps radioactif de base qu'est le radium. On exprime la valeur d'un échantillon de P.32 en curies, millicuries ou microcuries. C'est une équivalence qu'on exprime, les deux rayonnements n'étant pas en nature comparables.

Au cours de notre travail, nous nous sommes référés, quand il s'agissait de quantités de P.32 : d'abord à la valeur en millicuries indiquée par le fabricant, puis à la valeur d'un échantillon mesurée sur notre compteur de radiations exprimée en nombre de coups/minute. Les doses calculées en microcuries à partir d'échantillons différents, ne donnaient pas toujours des résultats cohérents. Nous étions à la recherche d'une mesure permettant de saisir avec certitude la quantité de P.32 injectée. Etant donné que la mesure finale s'exprime en nombre de coups/minute, le plus logique était de préciser le nombre de coups que l'on injectait au début de l'expérience. A chaque test, nous comptions une dose de plus qu'il n'y en avait d'animaux. On devait diluer cette dose au 1/250 et ne passer qu'un centimètre cube de cette dilution au compteur (ceci pour se trouver dans la zone d'utilisation normale du compteur). Nous avons ainsi une fois trouvé pour 10 microcuries une activité de 33×10^5 coups/minute. Une semaine plus tard, une dose prise dans un autre envoi de P.32 calculée pour faire aussi 10 microcuries avait une activité de 14×10^5 coups/minute. Ces désaccords, sans être aussi importants à chaque fois étaient assez fréquents.

Nous sommes convaincus que là réside un des points cruciaux de la mise au point de ce dosage et de sans doute tous ceux mettant en jeu des isotopes.

Il faut savoir le nombre de coups injectés et surtout il faut pouvoir être en mesure de reproduire des doses identiques ou variées mais à volonté. On peut invoquer que c'est là une simple question de technique ; mais il ne faut pas oublier qu'il

s'agit de manipuler des substances radioactives qui requièrent une certaine prudence et surtout beaucoup de parcimonie, nous avions de plus peu l'habitude des manipulations très méticuleuses de physique. Mais nous osons dire que soit de par sa fabrication, soit de par sa présentation, le P.32 est malheureusement bien loin de pouvoir être manipulé comme des unités d'insuline.

Deuxième point :

Les cheminements du phosphore dans l'organisme du rat sont complexes ; ce qui est pour nous le plus intéressant, c'est que nous en retrouvons dans les utérus et surtout en plus grande quantité dans les utérus stimulés. Nous prélevions au début un morceau du foie de chaque animal. Chez les témoins on a pu remarquer une certaine correspondance entre l'intensité de la radioactivité des utérus et celle des foies.

Plus intéressant est maintenant à signaler l'observation des résultats des témoins : à l'intérieur d'une même expérience, les animaux (d'une même nichée le plus souvent) injectés avec la même quantité de phosphore, ont des radioactivités de leurs utérus très voisines les unes des autres (Cf. tableau p. 26, deuxième colonne).

Pour expliquer l'utilisation du P. 32 par les utérus, sous l'influence des gonadotrophines, il faut rappeler que c'est sans doute en tant que constituant des acides nucléiques que nous le trouvons fixé sur ces utérus en prolifération.

NATI et ODEBLAD ont entrepris un travail du même genre que le nôtre, mais sur les ovaires de souris. Ils ont utilisé deux isotopes, celui du phosphore et celui du soufre. Leur technique, intéressante, mérite d'être rapidement décrite. Utilisant les ovaires de souris comme organes réactifs, ils utilisèrent deux

méthodes différentes pour mesurer la radioactivité des ovaires ; chaque animal donnant ainsi deux réponses se contrôlant. La première consiste, comme ce que nous faisons, en une mesure de toute la radioactivité de tout un ovaire ; mais la préparation au lieu d'être une hydrolyse se résume à un écrasement de l'ovaire entre deux lames de verre. Ces auteurs considèrent qu'ils obtiennent ainsi une présentation de leur matériel à peu près la même à chaque fois. Leur deuxième méthode est une radio-photographie : le deuxième ovaire est traité suivant les méthodes classiques d'histologie de fixation, d'inclusion, de découpage ; puis, la coupe obtenue est placée au contact d'un film sensible. Ils déterminent ainsi la valeur de la réaction folliculaire. Ils ont étudié ainsi la variation de la fixation du P.32 et du S.35 en fonction : de l'âge des animaux, de la dose d'hormone, et du fractionnement de celle-ci. Ils n'ont pas obtenu de fixation particulière du P.32 dans aucun des cas par rapport aux témoins. Nous expliquons, pour notre part, cet échec par le fait qu'un ovaire infantile stimulé a surtout une réaction folliculaire plus que prolifération. D'ailleurs, ils avaient des résultats positifs avec le S.35 qui doit pouvoir entrer plus facilement dans l'élaboration du liquide folliculaire que le P.32.

Nous pensons avoir suffisamment parlé déjà des travaux de Manaro, Walter S. Hill et Fournier pour qu'il soit inutile de les rappeler. Disons seulement qu'ils observaient chez le rat la fixation par la prostate et les vésicules séminales du P.32 sous l'influence de gonadotrophine chorionique.

L'utilisation d'isotopes radioactifs ne se présente pas toujours sous des aspects identiques. Nous en voulons comme exemple le cas de l'iode qui réalise des conditions idéales lors de son emploi en physiologie ou en pathologie thyroïdiennes. L'iode entre d'une manière intime dans le métabolisme thyroïdien ; les variations de l'iode radioactif détectées au niveau de corps thyroïdes reflètent d'une manière que l'on a de bonnes raisons de

penser assez fidèle, les variations de métabolisme de ces glandes. Nous espérons avoir fait comprendre que le phosphore ne joue pas un rôle aussi direct vis-à-vis des utérus.

— L'ANIMAL REACTIF :

Ce paragraphe va être nécessairement assez bref, puisque nous ne pensons pas utile de revenir sur la question elle-même du choix du rat en tant qu'animal réactif. Le rat nous a paru en tous points satisfaisant.

Dans certaines conditions assez étroites, la radioactivité utérine des témoins se rapproche d'une constante. En se reportant au tableau de la page 26, on peut voir que pour une dose de phosphore située aux alentours de 35×10^5 coups/minute, les témoins présentent une relative constance. Il est impossible de construire une courbe de la radioactivité des témoins en fonction de la quantité de phosphore injectée. Cela n'est peut-être pas tellement surprenant quand on pense que l'unité de grandeur choisie est basée sur la notion de rendement ; de cette façon, les doses faibles donnent des valeurs élevées (le rendement est bon, comme si le phosphore ne se dispersait pas en circulant dans l'organisme mais comme s'il allait se fixer, entre autres, au niveau de l'utérus). En augmentant les doses, les valeurs de cette radioactivité spécifique ne vont pas augmenter, comme on pourrait le croire, puisque le rendement va devenir moins bon. Nous échafaudons là rien que des hypothèses ; nous ne connaissons pas le cheminement et surtout le métabolisme du phosphore dans l'organisme du rat, suffisamment, pour pouvoir donner une certaine consistance à ces notions de fixation et de rendement en phosphore.

En conclusion, que pouvons-nous dégager des résultats obtenus ? Nous avons mis en pratique un principe qui devait montrer une différence dans la fixation du P.32 par un animal traité avec des gonadotrophines hypophysaires et celle d'un témoin. Nous avons eu cette différence d'une manière très nette et nous voulons faire remarquer que les animaux traités ont eu dans l'ensemble une réaction du type « tout ou rien » ; ces réactions étaient toujours confirmées par la présence ou l'absence de l'augmentation pondérale. Un pourcentage même important d'animaux ne réagissant pas, ne devrait pas nécessairement arriver à fausser des résultats, puisqu'il serait normal de considérer comme témoin tout animal ayant des réactions de témoin. Toutefois, pour éviter de donner des résultats trop optimistes ou suspectés d'une interprétation assez large, nous les publions dans toute leur rigueur.

Nous espérons avoir fait comprendre, en dépit de toutes ces réserves que nous avons obtènu la réaction *qualitative* nécessaire à ce dosage. La partie *quantitative* nous satisfait moins. Il ne faut pas perdre de vue que ce n'est pas une étude complète de la fixation du P.32 par l'utérus sous l'action de gonadotropes que nous avons entrepris, mais une méthode simple pour doser ces dernièes. C'est pour cette raison que nous disons que les variations que nous obtenons sont impropres à l'utilisation projetée. Nous sommes obligés de redire que les doses d'hormone pratiquées, qui peuvent paraître très faibles, sont justifiées par l'injection unique.

Nous avons aussi pratiqué des doses plus fortes en injections fractionnées, les conclusions à tirer sont identiques.

On remarquera que ce n'est qu'à partir d'une demi-unité que la réaction devient notable. Et encore à ce moment-là l'augmentation de la radioactivité n'est que de 100 %. Continuer au-delà de cette 1/2 unité ne peut que nous faire atteindre la zone

de « saturation » où il n'y a plus de réaction à un excès d'hormone. Nous considérions aussi comme nécessaire qu'il y ait une limite nette entre les témoins et les animaux traités avec une dose même minime.

Nous avons entrevu un moyen de tourner l'obstacle qu'est cette faible sélectivité ; c'est de modifier la dose de P.32.

Nous avions choisi celle d'environ 10 microcuries (ou plutôt 30 à 40×10^5 coups/minute) pour ne pas complètement submerger en phosphore nos rats qui pèsent à 21 jours, en moyenne 25 à 30 grammes, et pour nous trouver dans la zone optimum d'utilisation du compteur. Cependant, au cours de nos expériences, nous avons une fois utilisé par mégarde une quantité de P.32 dix fois plus forte ; nous avons eu alors un coefficient d'augmentation de fixation bien plus important. Nous ne détaillons pas le protocole qui était assez différent de celui décrit, mais nous avions pour une unité des utérus quatre fois plus radioactifs et pour 2, six fois. Nous avons essayé de reprendre ces conditions mais avons dû reculer devant les quantités importantes de phosphore nécessaires.

CONCLUSIONS

Nos travaux concernent l'utilisation du P.32 pour le dosage des principes gonadotropes présents dans l'urine humaine.

Nous relatons uniquement la partie représentant l'élaboration de la courbe d'étalonnage de ce dosage ; ceci fut effectué à l'aide d'extraits gonadotrophiques hypophysaires préparés par les Laboratoires Choay.

Nos expériences portant sur 63 animaux retenus sur 130 nous permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

1° L'obtention d'une dose constante de P.32 est difficile. C'est là un point essentiel.

2° Il est nécessaire d'avoir des doses de P.32 élevées supérieures à 40 microcuries.

3° Nous avons cependant obtenu un rendement de fixation progressivement croissant avec l'augmentation des doses de gonadotrophines.

Il ne paraît pas douteux qu'en utilisant de fortes doses de P.32 on doive aboutir à l'obtention d'un dosage plus précis qu'avec la méthode purement pondérale. Il n'en reste pas moins que dans l'état actuel des choses un tel procédé étant d'un prix de revient trop coûteux, la méthode pondérale garde tous ses droits.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes Condisciples je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'Honneur et de la Probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes Confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la Médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu : Le Doyen : R. SIGALAS.

Vu : Le Président du Jury :
R. SARIC.

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 7 juillet 1956.
Le Recteur :
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Bradburry (T.-J.), Brown (E.-S.), Brown (W.-E.). — *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1949, *71*, 228-232.

2. Diczfalusy (E.), Loraine (J.-A.). — Sources of error in clinical bioassays of serum chorionic Gonadotropin. *J. Clin. End. Metab.*, 1955, *15*, 424-434.

3. Fleischmann (W.), Fleischmann (S.-K.). — Uptake of P.32 in seminal vesicles of castrate rats after treatment with testosterone propionate. *J. Mount-Sinai Hosp.*, 1952, *19*, 228-232.

4. Girardeau (M.). — Contribution à l'étude des gonadotrophines urinaires chez l'homme normal (*Thèse*, Bordeaux 1954).

5. Gold (N.-I.), Sturgis (S.-H.). — Incorporation of radioactive phosphorus into the nucleic acid of surviving rat uteri, effects of steroids hormones in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 1955, *56*, 639-648.

6. Grauer (R.-C.), Strickler (H.-S.), Wolken (J.-J.), Cutuly (E.). — Influence of oestradiol on P.32 uptake by the uterus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1950, *75*, 651-654.

7. Manaro (J.-M.), Walter S. Hill, Fournier (J.-C. M.). — Influence de l'hormone gonadotrophique chorionique dans la fixation du P.32 par la prostate et la vésicule séminale du rat infantile. *Presse Médicale*, 1954, *59*, 1537-1538.

8. Nati (G.), Odeblad (E.). — Observation of the uptake of radiophosphate and radiosulfate in the mouse ovary under some hormonal conditions. *Acta Endocrinologica*, 1955, *19*, 43-48.

9. Riviere (J.), Girardeau (M.). — Extraction et dosage des substances gonadotropes de l'urine (Résultats chez l'homme adulte normal). *J. Méd. Bordeaux*, 1955, *132*, 470-483.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

Introduction 11

Principe du dosage 15

Description de notre technique 17

Résultats des expériences 23

Discussion 27

Conclusions 39

Bibliographie 43